

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Biologie
Ekologická a evoluční biologie



Jana Šrutová

NEINVAZIVNÍ OCHRANÁŘSKÁ GENETIKA MEDVĚDOVITÝCH
NON-INVASIVE CONSERVATION GENETICS OF URSIDS

Bakalářská práce

doc. RNDr. Pavel Huvla, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 08. 06. 2020

Podpis:

Abstrakt

Tato bakalářská práce se věnuje neinvazivní genetice a molekulární ekologii jednotlivých druhů z čeledi medvědovitých (Ursidae). Tato linie šelem je poměrně diverzifikovaná, jednotlivé druhy obývají různá prostředí od arktických oblastí po tropické deštné lesy a liší se i v případě trofických nik, které využívají. Jakožto pozůstatky megafaunových společenstev, které zaujímají důležité místo v ekologických sítích, bývají často označovány za druhy klíčové, deštníkové a vlajkové, které jsou důležité z pohledu ochránářské biologie. V Antropocénu je existence jednotlivých druhů čeledi Ursidae menší či větší měrou ovlivněná lidskou činností nebo jejími dopady a ačkoli se díky ochraně přírody podařilo početnosti některých druhů stabilizovat, kvůli zvětšující se lidské populaci stále častěji dochází ke ztrátě habitatů a konfliktům mezi lidmi a medvědy. Cílem práce bylo shrnout u jednotlivých druhů úroveň výzkumu populační struktury a demografie zejména s použitím neinvazivních genetických metod se záměrem získané poznatky v budoucnu implementovat do výzkumu medvěda hnědého v Západních Karpatech. Tomuto modelovému druhu je také věnována kapitola o neinvazivním vzorkování. Neinvazivní genetika je důležitým nástrojem pro výzkum zejména velkých, vzácných, vysoce mobilních a skrytě žijících druhů a je využívána napříč celou touto čeledí. Některým druhům je věnována ve výzkumu větší pozornost, to platí například pro pandu velkou, jejíž celková velikost populace v posledních letech díky ochránářským snahám roste. Naopak například v případě medvěda malajského není celková početnost známá a genetický výzkum je v začátcích.

Klíčová slova: neinvazivní genetika, ochránářská genetika, populační genetika, molekulární ekologie, medvědovití

Abstract

This bachelor thesis is devoted to non-invasive genetics and molecular ecology of particular species of ursids (family Ursidae). This carnivore lineage is quite diversified, particular species inhabit different environments from arctic regions to tropical rainforests and they also differ in trophic niches. As remnants of megafaunal communities that occupy important positions in ecological networks, they are often referred as keystone, umbrella and flagship species which are important in conservation biology. During the Anthropocene, the existence of particular species of Ursidae is more or less influenced by human activities or their impacts. Although nature conservation has managed to stabilize the abundance of some species, habitat loss and human-bear conflicts are becoming more frequent as a consequence of the expanding human population.

The aim of the work was to review the research of population structure and demography especially using non-invasive genetic techniques in particular species with intention to implement the acquired knowledge into brown bear research in the Western Carpathians in the future. The chapter about non-invasive sampling is focused to this model species.

Non-invasive genetics is important tool for research especially in large, rare, highly mobile and elusive species and it is used across this family. Some species are receiving more attention in research, for example the giant panda, whose overall population size has been growing in recent years due to conservation efforts. Conversely, for example, in the case of sun bear, the total number is unknown and genetic research is at the beginning.

Key words: non-invasive genetics, conservation genetics, population genetics, molecular ecology, Ursidae

Obsah

1.Úvod	1
2.Systematika recentní čeledi medvědovitých (Ursidae)	2
3.Fylogeneze čeledi medvědovitých (Ursidae)	3
4.Ochránářská a neinvazivní genetika	4
4.1. Teoretická východiska ochránářské genetiky a velikost populace	4
4.2. Metodické aspekty neinvazivní genetiky u medvědovitých	6
5. Neinvazivní přístupy a genetická struktura jednotlivých druhů Ursidae	9
5.1.Panda velká (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>)	9
5.2. Medvěd brýlatý (<i>Tremarctos ornatus</i>)	11
5.3. Medvěd malajský (<i>Helarctos malayanus</i>)	13
5.4. Medvěd pyskatý (<i>Melursus ursinus</i>)	14
5.5. Medvěd ušatý (<i>Ursus thibetanus</i>)	16
5.6. Medvěd baribal (<i>Ursus americanus</i>)	17
5.7. Medvěd hnědý (<i>Ursus arctos</i>)	18
5.8. Medvěd lední (<i>Ursus maritimus</i>)	21
6. Závěr	24
Seznam literatury	25

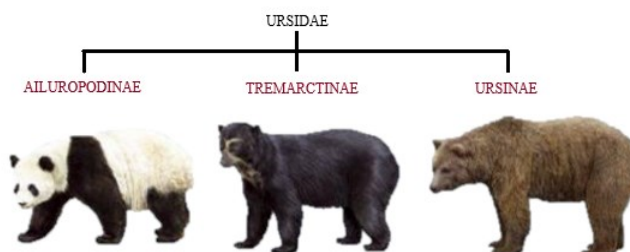
1. Úvod

Předkládaná bakalářská práce si klade za cíl poskytnout vhled do molekulárně ekologického výzkumu jednotlivých druhů z čeledi medvědovitých (Ursidae). Tuto čeleď z řádu Carnivora v současné době tvoří 8 druhů, které se vyskytují na území Jižní a Severní Ameriky, Evropy a Asie. Vyznačuje se širokým rozsahem ekologických nik, od arktických oblastí v případě medvěda ledního (*Ursus maritimus* Phipps, 1774), po tropické deštné lesy – například medvěd malajský

(*Helarctos malayanus* Raffles 1821). V rámci této čeledi také dochází k významné diferenciaci potravních nik a s tím související variací lebek a chrupu u jednotlivých druhů. Jediný herbivorní druh – panda velká (*Ailuropoda melanoleuca* David, 1869), u které dochází k postupné redukci špičáků a její zubní vzorec, (I) 3/3, (C) 1/1, (P) 4/4, (M) 2/2, se od ostatních druhů liší - (I) 3/3, (C) 1/1, (P) 4/4, (M) 3/3. Naopak medvědi lední, jakožto zástupci jediného hyperkarnivorního druhu napříč čeledí Ursidae, se vyznačují redukcí velikosti molárů. Ostatní druhy jsou omnivorní, v případě medvědů malajských a medvědů pyskatých (*Melursus ursinus* Shaw, 1791) se sklonem k insektivorii. Nezávisle na pozici v latitudinálním gradientu rozšíření, medvědi jsou až na medvěda ledního jako velcí omnivoři (nebo herbivoři v případě pandy velké) primárně vázáni na klimaxové lesní ekosystémy. Pokud vezmeme v potaz i jejich příslušnost k megafaunám a s tím související klíčovou pozici v ekologických sítích, je zřejmý i jejich status jako modelových druhů v ochranářské biologii (zejména u medvěda hnědého). Podle IUCN je v současné době 6 z 8 druhů medvědů na Červeném seznamu označeno jako druhy zranitelné. Z důvodu velkého domovského okrsku a vysokých nároků na prostředí se medvědi často dostávají do konfliktů s lidmi – dochází ke fragmentaci jejich habitatů, deforestaci, nelegálnímu lovu, nebo stále probíhajícího ilegálního obchodu pro účely čínské medicíny. Člověk se nepřímo podílí i na úbytku vhodného prostředí pro lední medvědy – vlivem globálního oteplování dochází k tání ledu v arktických oblastech, nebo i pro pandy velké, potravní specialisty – v budoucnu bude kvůli klimatickým změnám ubývat bambusu, kterým se pandy výhradně živí. Genetické studie, a především neinvazivní genetika, hrají v dnešní době důležitou roli ve výzkumu velkých savců, a hlavně ohrožených druhů. Ty nemusejí být pro vědecké účely zabity ani odchyceny. Výsledky výzkumů se pak dají implementovat v ochraně jednotlivých druhů a programů péče o ně.

2. Systematika recentní čeledi medvědovitých (Ursidae)

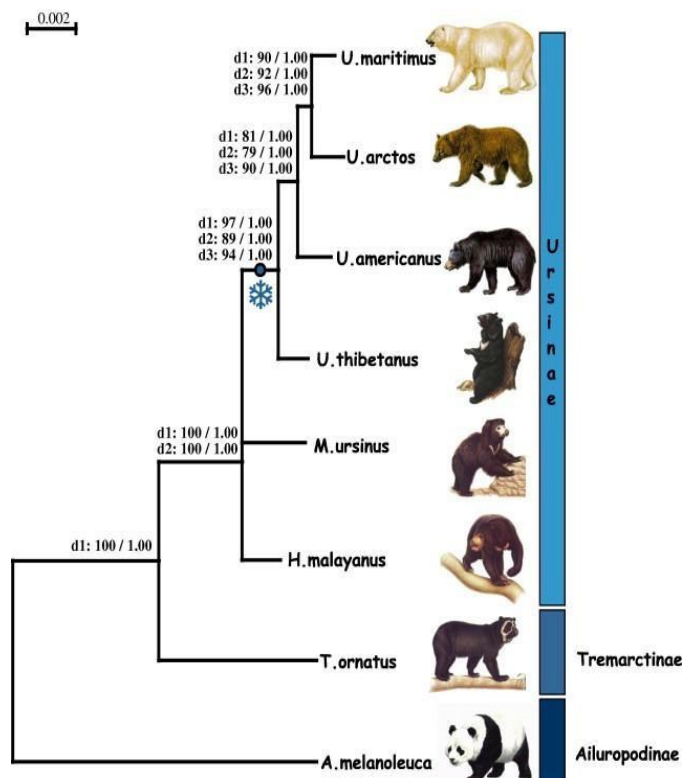
Čeleď medvědovití (Ursidae) se rozděluje na základě morfologické a genetické rozdílnosti do tří podčeledí: pandy (*Ailuropodinae*) s jediným zástupcem: pandou velkou (*Ailuropoda melanoleuca*), krátkohlaví medvědi (*Tremarctinae*) také s jedním zástupcem medvědem brýlatým (*Tremarctos ornatus* F.G. Cuvier, 1825) a podčeleď medvědi (*Ursinae*), která se dále rozděluje na tři rody: *Melursus* s jedním druhem: medvědem pyskatým (*Melursus ursinus*), *Helarctos* také s jedním druhem: medvědem malajským (*Helarctos malayanus*) a rod *Ursus* se čtyřmi recentními druhy: medvěd ušatý (*Ursus thibetanus* F.G. Cuvier, 1823), medvěd baribal (*Ursus americanus* Pallas, 1780), medvěd hnědý (*Ursus arctos* Linnaeus, 1758) a medvěd polární (*Ursus maritimus*) (Wilson Don E., 2009).



Obr.1 Dělení Ursidae do 3 podčeledí; upraveno (Wilson Don E., 2009)

3. Fylogeneze čeledi medvědovitých (Ursidae)

Na základě analýz 14 jaderných genů byla definitivně potvrzena hypotéza, která předpokládala, že panda velká byla prvním druhem, který se v rámci čeledi Ursidae oddělil, následoval medvěd brýlatý před cirká 12-15 miliony let (Goldman, 1989). Podčeleď *Ursinae* prošla rapidní diverzifikací před přibližně 5 miliony let. Dřívější práce založené především na analýzách mtDNA, která se jeví jako příliš homoplastická, neposkytly dostatečná data na bližší prozkoumání vztahů uvnitř podčeledi *Ursinae* (L. P. Waits, Sullivan, Brien, & Ward, 1999; Yu, Li, Ryder, & Zhang, 2004). Tato studie označila medvěda malajského a medvěda pyskatého za nejbazálnější druhy v rámci podčeledi *Ursinae*, ale pro objasnění pořadí větvení jsou zapotřebí další studie. Rod *Ursus* zahrnuje 4 recentní druhy medvědů obývajících severní polokouli, u kterých se vyskytuje hibernace. Mohlo by se jednat o monofyletickou skupinu (Yu et al., 2004), u které se tento znak v evoluci objevil pouze jednou. Alternativně by se mohlo jednat o symplesiomorfnní znak, který tento rod sdílí, ale u jiných druhů se v průběhu evoluce vytratil. V rámci tohoto rodu, druh medvěda baribala klastuje s kladem medvěda hnědého a medvěda ledního, k těmto třem druhům je pak sesterský taxon medvěd ušatý (Pagès et al., 2009).



Obr. 2 Fylogeneze čeledi medvědovitých (Pagès et al., 2008)

4. Ochránářská a neinvazivní genetika

Studium medvědovitých (Ursidae) je pomocí klasických terénních technik náročné především kvůli jejich soumravné/noční aktivitě, velkému domovskému okrsku a často špatně prostupnému terénu, který obývají. Z těchto důvodů jsou molekulární markery využívány v rámci neinvazivní genetiky důležitým nástrojem pro výzkum napříč celou čeledí Ursidae (Uno, Doko, Ohnishi, & Tamate, 2015). DNA je amplifikována z neinvazivních vzorků jako je například trus nebo chlupy, které jsou získány přímo v terénu. Zvíře tedy nemusí být pro vědecké účely usmrceno ani odchyceno (Waits & Paetkau, 2006). V současné době je pomocí molekulárních markerů zkoumán například genový tok (Kadariya et al., 2018), populační genetická struktura (Kunde, Martins, Premier, Fickel, & Förster, 2020) nebo evoluční historie (Pagès et al., 2008). Díky analýze mikrosatelitů se dají určit unikátní genotypy (genetický fingerprinting), které následně pomáhají objasnit, kolik jedinců se nachází v určité oblasti (Zhao et al., 2016). Určování pohlaví v rámci čeledi medvědovitých nejčastěji probíhá pomocí genu SRY, který je specifický pro samčí pohlaví (Taberlet, Mattock, Dubois-Paganon, & Bouvet, 1993).

4.1. Teoretická východiska ochránářské genetiky a velikost populace

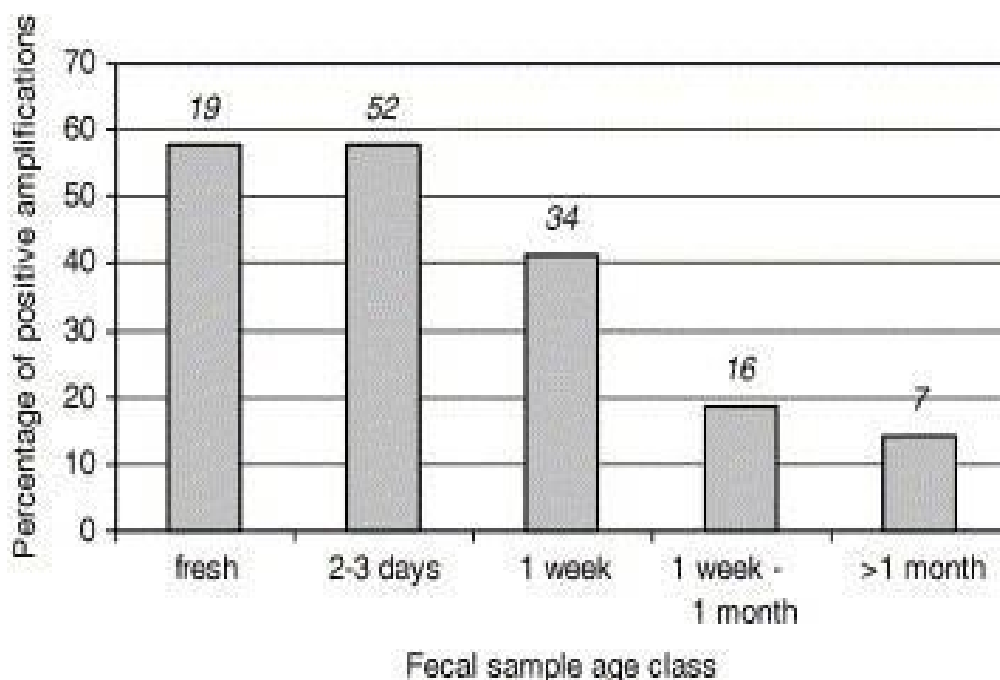
Klíčovým konceptem ochránářské genetiky je velikost populace, která je zásadním faktorem, který ovlivňuje riziko vzniku sledu procesů, označovaných jako extinkční vír (Blomqvist et al. 2010).

Termín efektivní velikost populace (N_e) zavedl americký genetik Wright v roce 1931 (Wright, 1931). Vyjadřuje velikost ideální Wright-Fisherovy populace (Fisher, 1930; Wright, 1931) ve které dochází ke snižování genetické diversity nebo inbrednímu křížení stejnou rychlostí jako v reálné populaci (Crow & Kimura, 1970). V reálných populacích se však nerozmnožují všichni jedinci, dochází ke generačnímu překryvu, rozdílnému počtu mlád'at nebo selekčním tlakům, tudíž efektivní velikost populace bývá nižší než skutečná velikost populace. Tento parametr je důležitý pro ochránářskou genetiku, zahrnuje evoluční potenciál a vnímavost populace na geneticky náhodné procesy (Skrbinšek et al., 2012).

V důsledku zvyšující se velikosti lidské populace dochází ke zmenšování a fragmentaci prostředí vhodného pro volně žijící živočichy. Ochránářští biologové se proto snažili sestavit konsensus o minimální velikosti životaschopné populace druhů a jejich areálové nároky. Minimální velikost životaschopné populace (MVP) je definována jako nejmenší počet jedinců dané populace, který je na 99% schopný přežít v dalších 1000 letech (Shaffer, 1981). Populace může čelit čtyřem různým jevům: 1. – přírodním disturbancím, jako jsou sucha, požáry nebo povodně, které se vyskytují nezávisle na čase; 2. – genetickým stochasticitám, které plynou ze změn v genovém toku například v důsledku efektu zakladatele nebo inbreedingu (Berry, 1971; Soule, 1980); 3. – environmentálním stochasticitám, které představují potravní či habitatoví konkurenti, predátoři, parazité nebo nemoci a za 4. – demografickým stochasticitám, které vznikají z náhodných událostí v úspěchu přežití či reprodukce konečného počtu jedinců (May, 1973; Roughgarden, 1975). V rámci ochrany přírody se používá tak zvané pravidlo 50/500, které uvádí, že počet jedinců v populaci by měl být v rozmezí 50-500, aby nedocházelo i inbrední depresi (Franklin, 1980), avšak má-li si silně ohrožená populace udržet svůj evoluční potenciál, minimální velikost životaschopné populace by měla být v řádech tisíců jedinců (Jamieson & Allendorf, 2012).

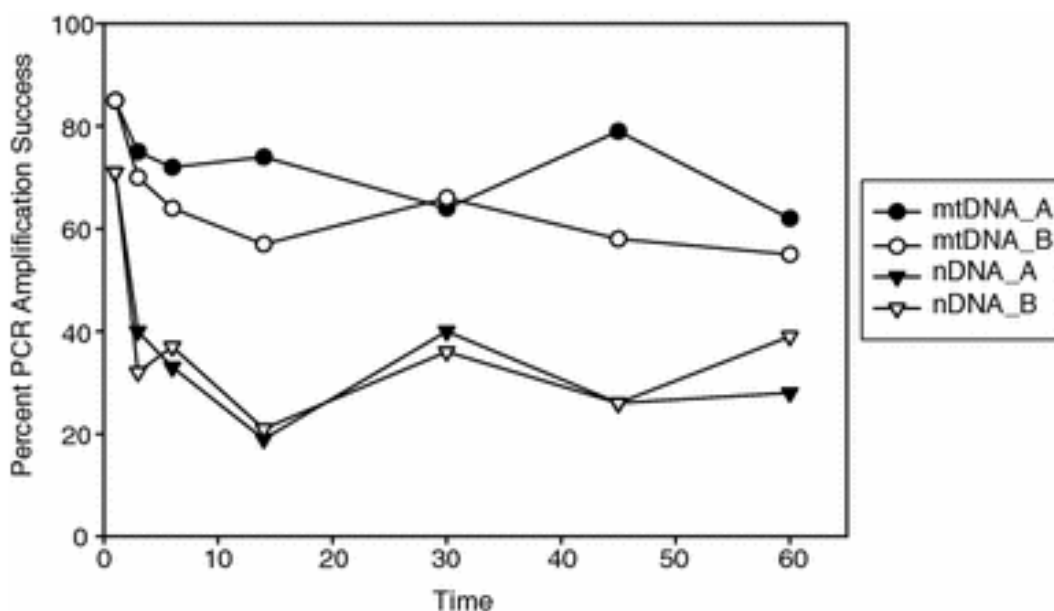
4.2. Metodické aspekty neinvazivní genetiky u medvědovitých

Neinvazivní genetika živočichů využívá pro získání DNA různé pobytové stopy, např. trus, moč, chlupy nebo peří, sliny na zbytcích potravy aj. Nejčastěji využívaným materiálem je trus. Nejdůležitějším faktorem pro úspěšnost amplifikaci DNA z trusu je stáří vzorku (Fernando, Pfrender, Encalada, & Lande, 2000; M. A. Murphy, Kendall, Robinson, & Waits, 2007). V přirozených podmínkách je však obtížné určit konkrétní stáří trusu, sběrači by měli u čerstvého trusu, který vyhodnotí jako nejdéle pět dní starý, předpokládat sliznatý a vlhký povrch, celkově svěží vzhled. Zápach trusu záleží na potravě, můžeme očekávat silný zápach po masité stravě, nebo zápach po trávě, rostlinách a jiných lesních plodech. V případě suchých plodů, jako je kukuřice nebo bukvice, trus skoro nezapáchá. V okolí trusu můžeme očekávat hmyz, avšak uvnitř se ještě nenacházejí jeho larvy. Po přibližně 4 dnech, u trusu, který je vystaven dopadu slunečního záření a teplému počasí již druhý den, trus ztrácí sliznatý povrch. S časem trus ztrácí i specifický zápach, mohou v něm být stopy po činnostech larev hmyzu, celkově vysychá a může zapáchat po půdě, takový trus již není potřeba sbírat, protože úspěšnost amplifikace DNA razantně klesá (Ladislav Paule, Diana Krajmerová, 2013; Skrbínšek, Jelenčíč, Waits, Kos, & Trontelj, 2010). Při neinvazivním vzorkování medvěda hnědého v severním Pákistánu byl nalezený trus rozdělen na základě subjektivního posouzení do pěti kategorií: 1. čerstvý, méně než 24 h starý trus; 2. 2-3 dny starý trus (kat. 1. a 2. ~58% úspěšnost amplifikace); 3. týden starý trus (~41% úspěšnost amplifikace); 4. mladší než 1 měsíc; 5. starší než jeden měsíc (Eva Bellemain et al.,



Obr. 3 Pět věkových kategorií trusu a úspěšnost amplifikace DNA (Eva Bellemain et al., 2006)

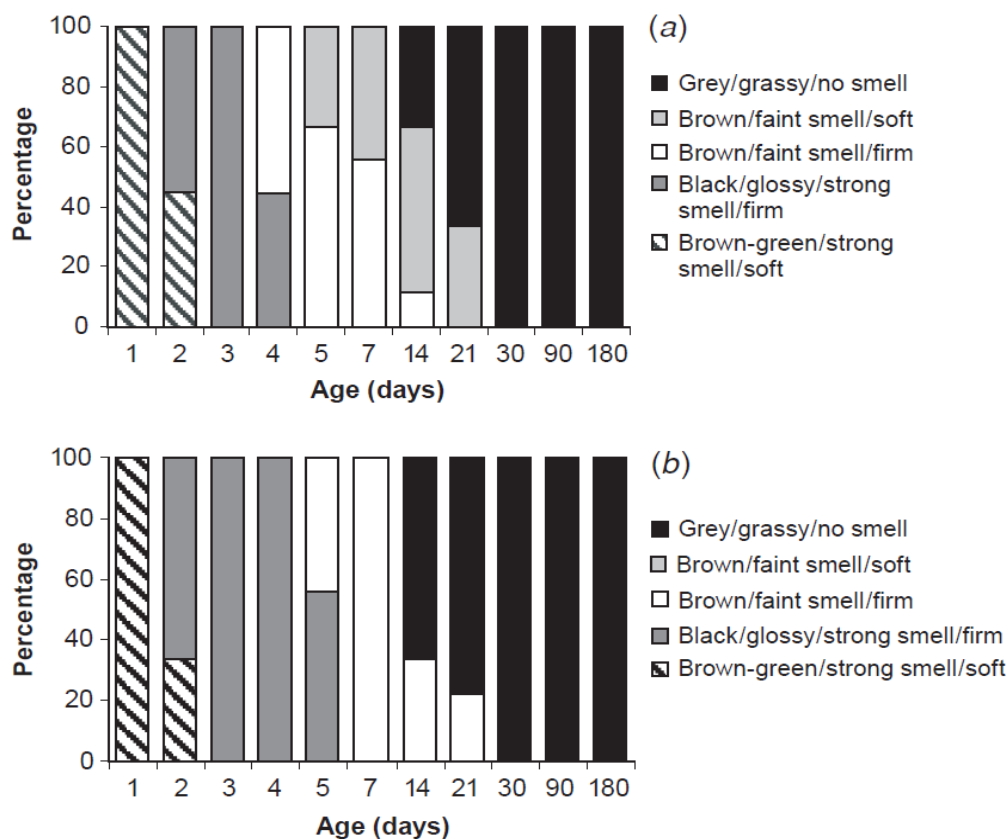
Dalším důležitým faktorem pro kvalitu vzorku jsou klimatické podmínky. Vyšší úspěch amplifikace DNA byl zaznamenán u vzorků, které byly vystaveny spíše suchému a teplému počasí (Laura E, Joseph, & Melvin E, 2000; M. A. Murphy et al., 2007). Vzorky, které byly zanechány na stanovišti A, jenž bylo jižně orientované, celkově sušší a slunnější s průměrnou denní teplotou 19,75 °C a průměrnou relativní humiditou 55,65 % vykazovaly oproti stanovišti B, jenž bylo umístěno v relativně chladném a vlhkém cedrovém lese, s průměrnou denní teplotou 19,54 °C a průměrnou relativní humiditou 58,89 %, vyšší úspěšnost amplifikace DNA. Experiment se krom podmínek stanovišť zaměřil také na vztah stáří vzorku a jeho úspěšné amplifikaci. Z obou stanovišť byl trus sbírán po 3, 6, 14, 30, 45 a 60 dnech (M. A. Murphy et al., 2007).



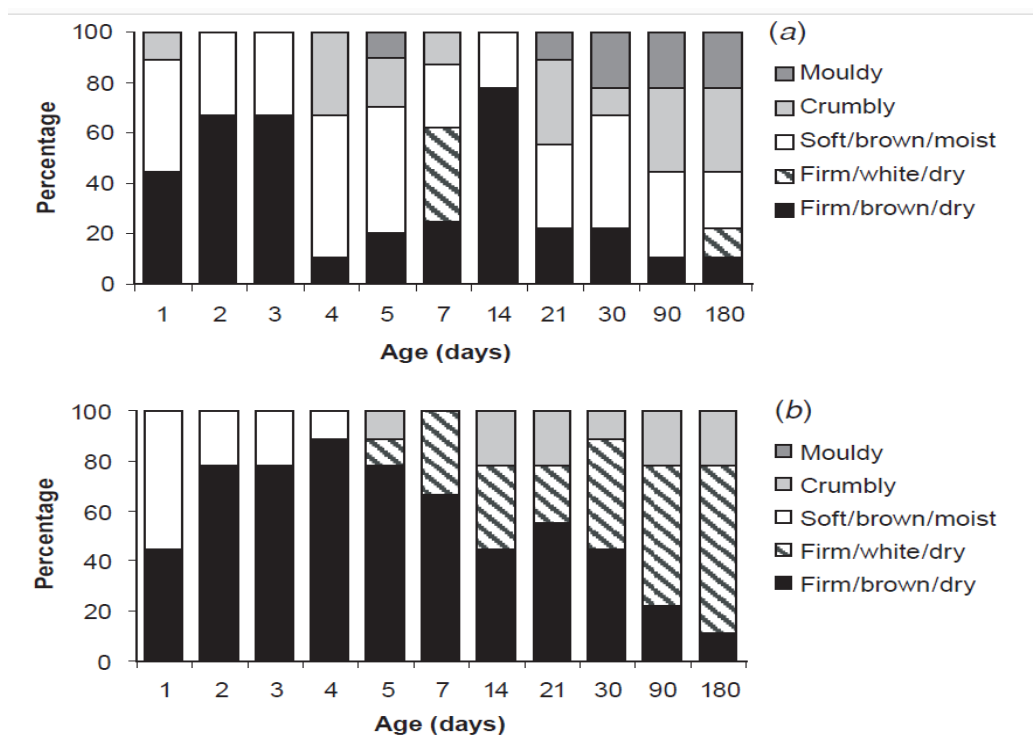
Obr. 4 Úspěšnost amplifikace mitochondriální a nukleární DNA 53 vzorků trusu v čase (M. A. Murphy et al., 2007)

V experimentální studii na medvědech hnědých v zajetí nebyly potvrzeny žádné signifikantní rozdíly amplifikace DNA ve vztahu k přijímané potravě. Trus jedinců krmených striktně masitou stravou, jelencem běloocasým (*Odocoileus virginianus* Zimmermann, 1780) byl amplifikován s 90% úspěšností pro mtDNA a s 68% úspěšností pro nDNA, zatímco trus jedinců, kteří byli krmeni pouze rostlinnou stravou, různými druhy trav (*Poa pratensis*, *Trifolium spp.*, *Haplopappus hirtus*) byl amplifikován s 92% úspěšností pro mtDNA a 76% pro nDNA (M. A. Murphy et al., 2007; M. A. Murphy, Waits, & Kendall, 2003). Studie, která se zaměřila na stanovení genotypu jedince pomocí mikrosatelitů z neinvazivních vzorků trusu ve vztahu k ročnímu období a stáří vzorku, ukázala, že se úspěšnost amplifikace se stářím vzorku snižuje a zároveň se zvyšuje poměr chyb při genotypování. Dále se

prokázalo, že vzorky, které byly sbírány v průběhu letního období, byly amplifikovány s vyšší úspěšností. Ačkoliv se studie přímo nezabývala medvědem hnědým, ale klokanem skalním (*Petrogale penicillata* Gray, 1825) a liškou obecnou (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758), dá se říci, že tyto druhy částečně sdílejí trofickou niku. Výsledky také ukázaly, že celková kvalita DNA v trusu může negativně korelovat se zvýšenou vlhkostí a deštěm (Piggott, 2004).



Obr.5 Vzhled trusu klokana skalního podle barvy, tvaru, textury a zápachu od 1 do 180 dní (a) v zimě a (b) v létě (Piggott, 2004)



Obr. 6 Vzhled trusu lišky obecné podle barvy, tvaru, textury a zápachu od 1 do 180 dní (a) v zimě a (b) v létě (Piggott, 2004)

Přestože zatím nevznikly žádné studie zabývající se vztahem kvality DNA, úspěchu amplifikace a období sběru trusu medvěda hnědého, dosavadní výsledky poukazují na nejvyšší úspěch amplifikace v období podzimu začátku zimy ve Slovinsku, především v oblasti Dinárského pohoří (Skrbinšek et al., 2019). V jiných oblastech výskytu medvěda hnědého je systematický sběr trusu nejčastěji prováděn během léta a podzimu, respektive od srpna do října v oblasti středního Švédska (Tallmon, Bellemain, Taberlet, & Swenson, 2004) (Bellemain and Taberlet 2004), od července do začátku října v národním parku Deosai v severním Pákistánu (Eva Bellemain et al., 2006). Na území Slovenské republiky, především v oblastech, kde byl již dříve potvrzen výskyt medvěda hnědého, probíhal systematický monitoring od 13. září do 30. listopadu 2013 (Ladislav Paule, Diana Krajmerová, 2013).

5. Neinvazivní přístupy a genetická struktura jednotlivých druhů Ursidae

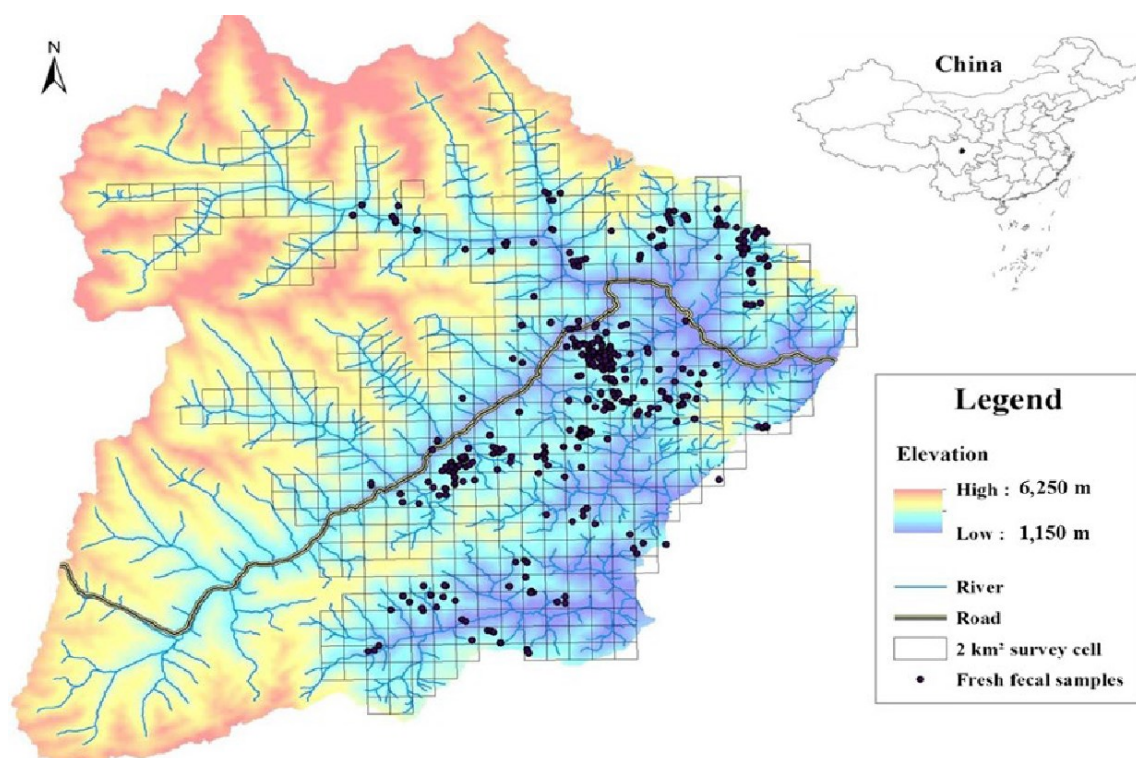
5.1. Panda velká (*Ailuropoda melanoleuca*)

Panda velká je nejohroženějším zástupcem čeledi Ursidae. V současné době je pro tento vlajkový druh největší hrozbou degradace habitatů a fragmentace krajiny. Podle Červeného seznamu je řazena jako zranitelný druh, jehož početnost roste. Od roku 1974, cirká každých

10 let, probíhají v Číně národní průzkumy, které si stanovují za cíl určení velikosti populace, to především na základě rekognizace trusu od různých jedinců a zohlednění jejich domovského okrsku. V průběhu 4. národního průzkumu byly shromážděny vzorky trusu na analýzy DNA, bohužel se v mnoha případech nepodařila extrakce DNA kvůli staří sesbíraných vzorků. Určení celkové početnosti pand velkých v Číně na základě analýz DNA z trusu získaného během 4. národního průzkumu tak nadále zůstává nevyřešeno, podařilo se však stanovit početnosti alespoň v některých rezervacích (IUCN, 2016). Poprvé se systematické neinvazivní vzorkování, v klíčové pandí rezervaci Wanglang a v okolních částech rezervací s ní sousedící, praktikovalo nejprve od října do prosince 2003 (bylo nashromážděno 55 neinvazivních vzorků), následně od února do srpna roku 2004 (319 vzorků). Zkoumaná oblast se nachází v severní části Minshan Mountains v nadmořské výšce od 2500 m.n.m. do 3000 m.n.m, kde se vyskytuje největší populace pand. Z celkem 374 sebraných vzorků trusu, které byly posouzeny na základě vnější vrstvy hlenu jako méně než 2 týdny staré, se podařilo díky 9 mikrosatelitovým lokusům určit 66 unikátních genotypů. Na základě analýzy genu SRY bylo zjištěno 35 samců. V porovnání s výsledkem z této oblasti ze 3. národního průzkumu, který probíhal v roce 1998 a bylo určeno pouze 27 jedinců, se jedná o více než stonásobný nárůst populace. Vysvětlením může být přesnější odhad velikosti populace na základě analýz DNA oproti starším metodám pouhého rozpoznávání trusu, efektivnější vzorkování dané oblasti, započítání mláďat nebo případné migrace jednotlivých zvířat.

Díky metodě mark-recapture a modelu ECM v programu CAPWIRE, který předpokládá, že k defekaci a následnému sběru trusu dochází u každého jedince stejně, stanovili celkovou velikost populace v této oblasti na 67-72 jedinců (95% konfidenční interval). Celkovou velikost populace pand velkých v Číně pak odhadli na 2500-3000 jedinců (Zhan et al., 2006). Jak bylo již dříve zmíněno, největší hrozbou pro populace pand velkých v Číně je ztráta vhodných habitatů a fragmentace krajiny, ke které často dochází při budování nové silniční infrastruktury i skrze přírodní rezervace (Zhao et al., 2016). Příkladem může být silnice G350, která vede skrz přírodní rezervaci Wolong. Tato rezervace se nachází v subalpinském regionu v nadmořské výšce 1150-6250 m. Při systematickém sběru trusu pand v této oblasti, který probíhal od března 2015 do ledna 2016, se podařilo získat celkem 539 vzorků, které byly na základě vnější vrstvy hlenu posouzeny jako méně než 2 týdny staré. Pomocí 7 mikrosatelitových lokusů se podařila amplifikace v 322 případech (úspěšná amplifikace min. 6 lokusů) a bylo určeno 142 unikátních genotypů. Pomocí neprostorového capture-mark-recapture (CMR) ECM modelu v programu CAPWIRE, který předpokládá vícečetný výskyt v průběhu období a odhaduje velikost populace na méně než 200 jedinců (Mumma, Zieminski, Fuller, Mahoney, & Waits, 2015), byla celková velikost populace stanovena na 164 jedinců

(153-175 při 95% konfidenčním intervalu). V průběhu období sběru trusu však populace nebyla uzavřena a byla možná migrace pand z/do rezervace. Při zohlednění těchto faktorů se tedy použila ještě metoda SECR, která stanovuje počet jedinců na km². Tato analýza stanovila denzitu výskytu pand na 0,13/km² (0,11-0,16 při 95 % konfidenčním intervalu), respektive 137 jedinců v rezervaci (115-163 při 95 % konfidenčním intervalu). Mimo jiné byla zjištěna relativně vysoká genetická variabilita, nízká míra inbreedingu a pozorovaná heterozygotnost (H_o) se rovnala 0,604. Dva jedinci byli zjištěni po obou stranách silnice G350, zdá se tedy, že tato silnice není překážkou pro migraci. Oproti 3. Národnímu průzkumu bylo v rezervaci Wolong díky analýzám DNA a CMR modelování zjištěno o 50 % více pand velkých, neinvazivní genetiky se tedy jeví jako výborný nástroj pro určení velikosti populace (Qiao et al., 2019).



Obr. 7 Vzorkovaná oblast rezervace Wolong, Čína (Qiao et al., 2019)

5.2. Medvěd brýlatý (*Tremarctos ornatus*)

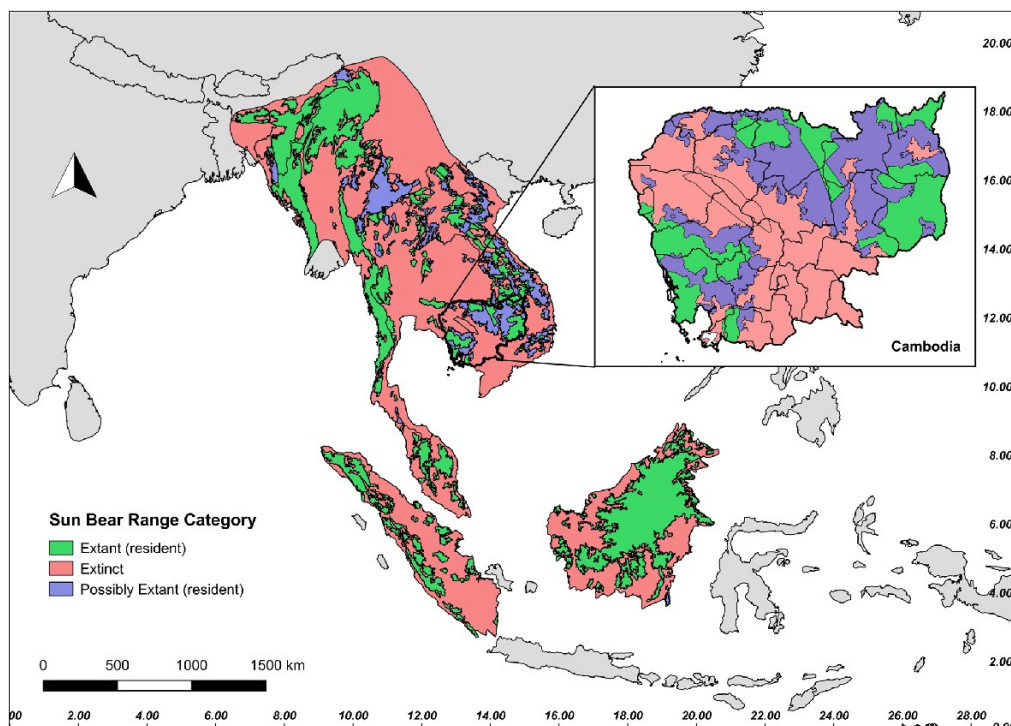
Medvěd brýlatý je jediným recentním zástupcem podčeledi *Tremarctinae* a jediným druhem z čeledi medvědovitých (Ursidae), který se přirozeně vyskytuje v Jižní Americe. Podle IUCN je řazen jako zranitelný druh, jehož početnost populace klesá (IUCN, 2018). Je ohrožen především fragmentací a ztrátou vhodných habitatů, pytláctvím (Kattan et al., 2004) a novou hrozbou může být i nelegální lov pro účely čínské medicíny, především pro populaci v Ekvádoru (Ruiz-García, Orozco-terWengel, Castellanos, & Arias, 2005), která se také jeví jako nejméně geneticky diverzifikovaná (Ruiz-García, 2003; Ruiz-García et al., 2005; Viteri & Waits, 2009).

Na základě dat získaných z 82 převážně invazivních vzorků, které byly získány ze třech geograficky oddělených populací medvědů, bylo zjištěno, že jsou tyto populace od sebe silně izolované a vykazují velkou a signifikantní genetickou heterogenitu. Pro všechny tři populace byla očekávaná heterozygotnost stanovena jako $H_e=0,38$, nejnižší heterozygotnost pak měla Ekvádorská populace, $H_e=0,24$, což z ní v rámci genetické variability činí nejohroženější populaci napříč všemi medvědotvými. Jelikož není žádný důkaz o genetických bariérách, které by omezovaly tok genů mezi těmito populacemi, může být jejich nízká heterozygotnost způsobena dávnými událostmi. Mohlo se jednat například o příchod člověka do Jižní Ameriky nebo nástup posledního glaciálního maxima (před ca 16–30 tis lety), a s tím související Wahlundův efekt, tzn. rozdělení velké populace na více menších, klesající frekvence heterozygotů a fixace rozdílných alel v malých populacích. Odhad recentní velikosti celkové populace

na základě dat získaných z této studie činí 24 – 25 tisíc jedinců, pokud stanovíme $N_e/N=0,75$ a mutační rychlost $2,5 \times 10^{-4}$ (Ruiz-García, 2003). Je poměrně těžké studovat medvěda brýlatého ve volné přírodě, především kvůli nepřístupnosti terénu. Při monitorování habitatů vhodných pro výskyt tohoto druhu v rezervaci Cayambe-Coca v Ekvádoru se mimo jiné podařilo shromáždit celkem 95 vzorků trusu a 22 vzorků srsti. Studovaná oblast se nacházela mezi 1600 m.n.m, kde průměrná teplota činí 16 °C průměrné roční srážky 2500 mm, a 4500 m.n.m, kde je průměrná teplota 9 °C a roční úhrn srážek 1500 mm (Cuesta, Peralvo, & Manen, 2003). Z těchto neinvazivně získaných vzorků se podařilo získat genetický profil v 10 případech a určit tak celkem 9 jedinců, úspěšnost amplifikace byla, oproti vzorkům, které byly shromážděny od 16 zvířat v zajetí (98 % úspěšnost amplifikace) velmi nízká a docházelo k častějším chybám při genotypování. Očekávaná heterozygotnost stanovena pro divokou populaci $H_e=0,45$ a pro zvířata v zajetí $H_e=0,50$ je vyšší než v předchozích pracích (Ruiz-García, 2003; Ruiz-García et al., 2005), nutno však podotknout, že se v této studii zvýšil počet mikrosatelitových lokusů (pro stanovení genetického profilu úspěšná amplifikace min. 6 z 10 lokusů). Zjištěná genetická diverzita je však stále nižší v porovnání s ostatními druhy medvědů a srovnatelná s izolovanými populacemi medvěda hnědého (L. Waits, Paetkau, & Strobeck, 2000). Pro pochopení nízké genetické diverzity medvěda brýlatého a upřesnění velikosti populace je potřeba více dat, neinvazivní genetika se v případě tohoto skrytého žijícího druhu jeví jako dobrý nástroj pro objasnění těchto otázek (Viteri & Waits, 2009).

5.3. Medvěd malajský (*Helarctos malayanus*)

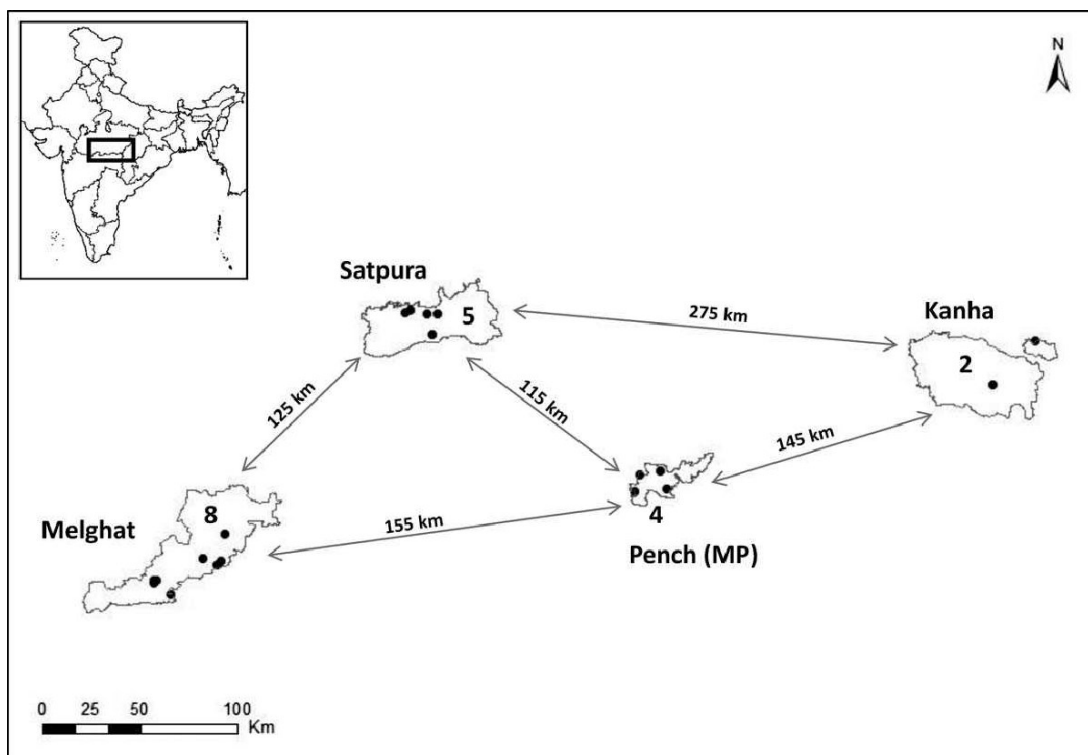
Ačkoliv u medvěda malajského chybí empirické odhady velikosti populace, je na základě vyhodnocení ztráty a degradace vhodných habitatů, pytláctví a nelegálního obchodu pro účely čínské medicíny řazen jako zranitelný druh, jehož početnost se snižuje a díky deforestaci se předpokládá ještě rychlejší pokles do budoucna (Scotson et al., 2018). V současné době existuje pouze jedna studie, která se zabývá analýzami jaderné DNA u tohoto druhu. Během srpna roku 2013 se podařilo nashromáždit celkem 185 převážně neinvazivních vzorků (trus, sliny, drápy, ...) od 94 medvědů žijících v záchranné stanici v Kambodži a od jednoho medvěda ze zoo. Tito medvědi byli zabaveni z nelegálního trhu, nebo byli stanici darováni. Pro určování genetického profilu se použilo 17 mikrosatelitových lokusů, avšak 5 lokusů bylo z dalších analýz vyloučeno. Podařilo se určit 68 unikátních genotypů (min. 11 ze 12 lokusů bylo správně amplifikováno). 35 genotypů pocházelo od jedinců, kde bylo dohledatelné místo odchyty. Pomocí programu STRUCTURE byly tyto genotypy s vysokou pravděpodobností ($Q \geq 85\%$) rozděleny do dvou klastrů, 10 jedinců tak pocházelo ze západní Kambodži a 17 z východní Kambodži. 8 jedinců mělo genetické pozadí obou klastrů, což svědčí o existenci současného, nebo v nedávné minulosti probíhajícího genového toku mezi západní a východní populací. Zbýlých 33 genotypů pocházelo od jedinců, u nichž nebyl dohledán původ odchyty, na základě stejných analýz se je ale podařilo opět přiřadit k západní ($n=17$) nebo východní ($n=9$) populaci a 7 jedinců, kteří měli genetické pozadí obou klastrů. 53 ze 68 jedinců bylo tedy s vysokou pravděpodobností ($Q \geq 85\%$) přiřazeno k jedné z těchto dvou populací. Pozorovaná heterozygotnost (H_o) pro západní populaci činila 0,494 a pro východní 0,476. Pro srovnání – podobnou pozorovanou heterozygotnost ($H_o = 0,44$) má izolovaná a ohrožená populace medvěda hnědého ve Španělsku (Pérez et al., 2009). Pro absenci dalších studií založených na analýzách nukleární DNA je obtížné dělat závěry a hodnotit genetickou diverzitu medvěda malajského. V budoucnosti by bylo ideální uskutečnit podobný výzkum i v dalších zemích výskytu (Laos, Vietnam, Thajsko) a pokusit se na základě získaných dat určit celkovou velikost populace (Kunde et al., 2020).



Obr.8 Mapa rozšíření medvěda malajského (Kunde et al., 2020)

5.4. Medvěd pyskatý (*Melursus ursinus*)

Medvěd pyskatý je endemický druh Indického subkontinentu a taktéž jediný recentní zástupce rodu *Melursus* (Servheen & Herrero, 1999). Ačkoli zatím neexistují žádné spolehlivé odhady velikosti celkové populace, je řazen jako zranitelný druh, jehož početnost klesá (Dharaiya, N., Bargali, H.S. & Sharp, 2020), což je způsobeno především ztrátou a fragmentací habitatů, na většině území výskytu dochází ke přeměně přirozených habitatů na zemědělskou půdu a monokulturní plantáže (Akhtar, 2008). V průběhu období od listopadu 2009 do května 2010 se uskutečnilo první systematické neinvazivní vzorkování tohoto druhu ve 4 tygřích rezervacích v centrální Indii. Sběr vzorků probíhal podél lesních cest, pro rozpoznávání trusu mimo jiné pomohla přítomnost mravenců a termitů, tento druh se totiž vyznačuje zvýšenou mírou insektivorie (Collins, 2015). Podařilo se shromáždit celkem 190 vzorků trusu a 4 vzorky chlupů, z tohoto množství vybrali celkem 19 vzorků ze geograficky oddělených míst (viz Obr.9) a 2 chlupové vzorky od medvědů žijících v zajetí, u kterých byl znám původ.



Obr. 9 Geograficky oddělené místa vzorkování (Sharma et al., 2013)

Celkem tedy 21 neinvazivních vzorků sloužilo pro aplikaci mikrosatelitového panelu, který se skládal z 18 mikrosatelitových lokusů již dříve použitých na výzkum medvěda baribala (Paetkau, Calvert, StirlingT, & Strobeck, 1995; Paetkau & Strobeck 1994; David Paetkau, Shields, & Strobeck, 1998), medvěda hnědého (E. Bellemain & Taberlet, 2004; Taberlet P., 1997), medvěda ledního (Poissant & Davis, 2011) a psa (*Canis lupus familiaris* Linnaeus, 1758) (Ostrander, Sprague, & Rine, 1993). Na základě úspěchu amplifikace, počtu amplifikovaných alel v lokusu, míry pozorované heterozygotnosti a nízké míře chyb při genotypování bylo zvoleno celkem 7 polymorfních lokusů, které byly použity v dalších analýzách. Nejdříve amplifikovali DNA ze 194 neinvazivních vzorků pomocí 3 mikrosatelitových lokusů, pokud se alespoň 2 amplifikovaly (v 89 případech) následovala amplifikace DNA pomocí zbylých lokusů. Celkem bylo tedy úspěšně amplifikováno 58 genotypů (alespoň 5 ze 7 lokusů) a pomocí programu CERVUS (Kalinowski, Taper, & Marshall, 2007) určeno 55 jedinců. Další analýzy stanovily průměrnou pozorovanou heterozygotnost jako $H_o=0,53$ a průměrně 8,8 alel na jeden lokus. V případě skrytě žijících živočichů, kterým medvěd pyskatý bezesporu je, se jeví neinvazivní vzorkování jako užitečný nástroj. Do budoucna by bylo díky neinvazivnímu vzorkování a 7 vysoce polymorfním mikrosatelitovým lokusům, získaných z této práce, možno studovat populační genetiku ve větším měřítku (Sharma et al., 2013).

5.5. Medvěd ušatý (*Ursus thibetanus*)

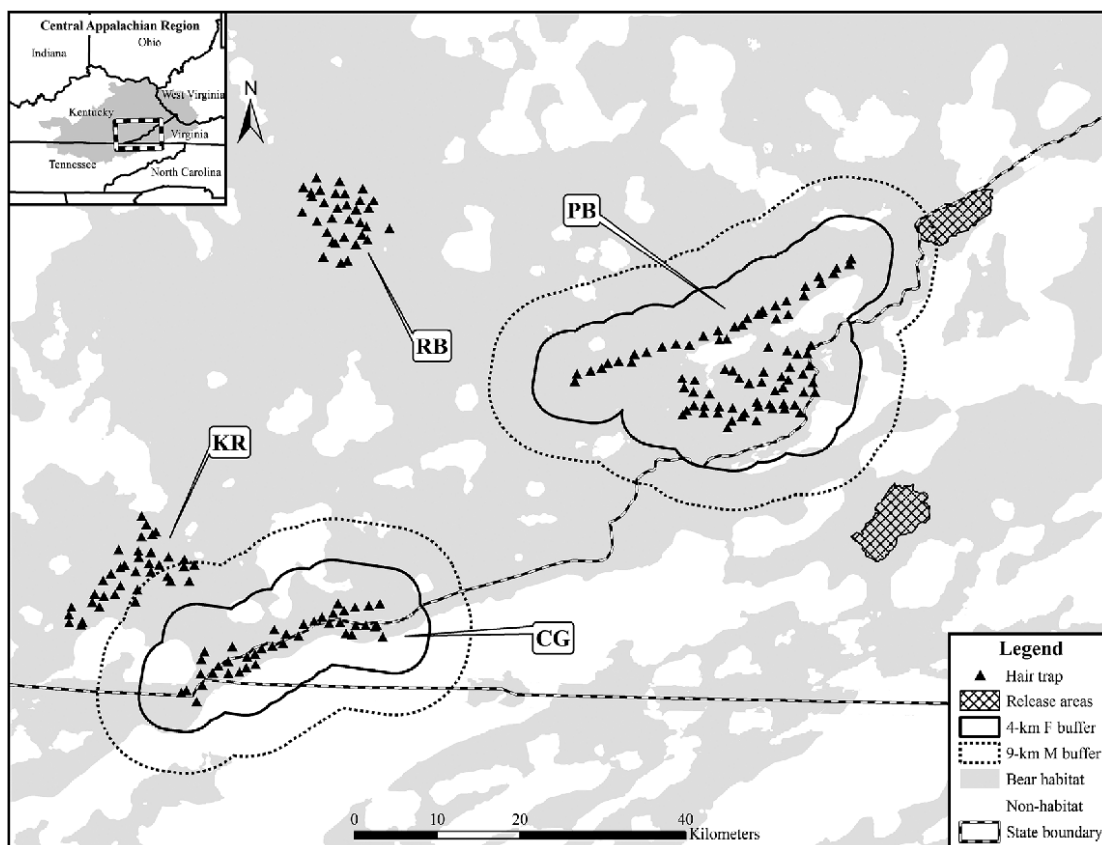
Z důvodu ilegálního lovu, obchodování s medvědy nebo jejich částmi pro účely Čínské medicíny a postupné ztrátě vhodných habitatů je druh medvěda ušatého uváděn jako zranitelný jehož počty klesají (Garshelis, D. & Steinmetz, 2016). Na základě těchto faktorů byl stanoven empirický odhad, z něhož vyplývá, že se například v oblasti Pákistánu v příštích 30-40 letech sníží početnost populace medvěda ušatého o 33% (Abbas, Bhatti, Haider, & Mian, 2014).

Tento druh má poměrně široký areál rozšíření, neexistuje početní odhad celkové velikosti populace (Garshelis, D. & Steinmetz, 2016), avšak v jednotlivých státech vznikly již mnohé genetické práce. Ačkoliv je tento druh na Červeném seznamu uveden jako zranitelný, například populace ve středním a severovýchodním Japonsku jsou stále vystaveny vysokému tlaku ze strany lovců a kvůli rozšiřující se lidské populaci také stoupá počet konfliktů mezi lidmi a medvědy (Uno et al., 2015), naopak například v Jižní Koreji je lov od roku 1982 zakázán, avšak k ilegálnímu odlovu stále dochází. Genetické analýzy pomocí 16 mikrosatelitových lokusů reintrodukované populace v Národním parku Jirisan, která se skládala z 27 mlád'at ze Severní Koreji a ruského Dálného východu, stanovily očekávanou heterozygotnost (H_e) 0,648 pro jedince z Ruska a 0,676 pro jedince z Severní Koreji (Kim et al., 2011). Tyto míry H_e se v měřítku populační genetiky medvěda ušatého jeví jako střední, některé japonské populace mají nižší H_e (0,53-0,70), což z nich dělá populace ohroženější (Ohnishi, Saitoh, Ishibashi, & Oi, 2007). Naopak výzkum, který probíhal mezi lety 2015 a 2016 v přírodní rezervaci Annapurna v Nepálu, stanovil H_e pro tamní populaci jako 0,76. V nadmořské výšce od 1725 m do 3580 m se podařilo v průběhu deštivého období od července do září ($n=44$) a podzimního období od října do prosince ($n=82$) nasbírat celkem 126 vzorků DNA z trusu a 21 vzorků chlupů. Chlupy byly získány z chlupových pastí a DNA z trusu byla získána pomocí vatového tamponu, kterým byl otřen povrch trusu a následně uložen do lahvičky s etanolem. Úspěšnost amplifikace DNA z trusu byla signifikantně vyšší v podzimním období (84 %) než v deštivém období (52 %). Vzorkování probíhalo na 525 km², pomocí 8 mikrosatelitových lokusů bylo určeno celkem 60 unikátních genotypů (11,5 jedince/100 km²). Ačkoliv je v Nepálu medvěd ušatý druhem s nízkou prioritou ochrany, tamní populace je panmiktická, genový tok probíhá mezi jednotlivými oblastmi a jedinci se pohybují na velké vzdálenosti, což bylo potvrzeno díky zpětným záchytům (Kadariya et al., 2018). Podobná očekávaná heterozygotnost ($H_e=0,72$) byla stanovena i pro populaci vyskytující se v Národním parku Dachigam a jeho přílehlém okolí v Indii. V této studii bylo využito primárně chlupových pastí (v každém předem připraveném čtverci 2x2 km byla umístěna past s lákadlem v podobě medu nebo ovoce a fotopast), nebo byly vzorky chlupů získávány z oplocení podél zemědělských polí. Pomocí 7 mikrosatelitových lokusů se podařilo

určit 109 unikátních genotypů. V 11 případech se jednalo o „problémové“ jedince (6 samců a 5 samic), kteří se přižívali na zemědělských plodinách, byli odchyceni a následně převezeni do Národního parku. V 7 případech se tito jedinci vrátili do lidmi obhospodařované krajiny (v průměru po 10 dnech). Pouze 4 jedinci se dále vyskytovali poblíž místa vypuštění, což by teoreticky mohlo souviset na sezóně a dostupnosti přirozené potravy. Neinvazivní genetika je tedy také výborným nástrojem pro monitoring pohybu a to nejen jedinců, kteří se dostávají do konfliktu s lidmi (Mukesh, Sharma, Charoo, & Sathyakumar, 2015).

5.6. Medvěd baribal (*Ursus americanus*)

Na rozdíl od ostatních druhů medvědovitých (Ursidae) je medvěd baribal společně s medvědem hnědým zařazen na Červeném seznamu jako druh málo dotčený (Collins, 2015), jehož početnost roste. Velikost celkové populace v Severní Americe se odhaduje na více než dvojnásobek oproti všem ostatním zástupcům Ursidae dohromady. Pouze některé izolované populace jsou ohroženy, jinak je povolen odlov na celém území výskytu krom Mexika. (Garshelis, Scheick, Doan-Crider, Beechman, & Obbard, 2016). Během 90. let minulého století bylo do oblasti kolem hranic Kentucky a Virginie v USA reintrodukováno celkem 55 jedinců. Pro monitorování a vyhodnocení úspěšnosti rekolonizace v této oblasti se využilo systematického neinvazivního vzorkování a mikrosatelitového genotypování. Během let 2012-2013 byly do 4 předem vybraných podoblastí PB, CG, RB a KR (viz Obr.10) umístěny chlupové pasti, podařilo se získat celkem 1503 vzorků chlupů, v oblasti PB 946 vzorků, z nichž 419 bylo pomocí 7 mikrosatelitových lokusů úspěšně amplifikováno (46 % úspěšnost) a bylo určeno 142 jedinců (65 samců a 77 samic), v oblasti CG pak 544 vzorků, 224 bylo úspěšně amplifikováno (43 % úspěšnost) a bylo získáno 54 unikátních genotypů (31 samců a 23 samic). Oblasti RB a KR byly vyloučeny z dalších analýz pro malý počet získaných vzorků.



Obr. 10 PB, CG, KR, RB – označení jednotlivých zkoumaných oblastí (S. M. Murphy et al., 2016)

Pro vyhodnocení genetické struktury a genového toku se následně přidaly další 4 mikrosatelitové markery, byla zjištěna nízká, ale významná genetická diferenciace mezi oblastí PB a CG, ale kvůli relativně vysoké příbuznosti jedinců z obou oblastí PB a CG a genovému toku mezi nimi, došlo ke sloučení obou oblastí pro další analýzy. Následně byla stanovena efektivní velikost populace $N_e = 71$ (57-87 jedinců při 95 % konfidenčním intervalu) a očekávaná heterozygotnost $H_e = 0,78$. Pomocí neprostorového capture-recapture modelu SECR byla stanovena denzita výskytu pro obě oblasti dohromady 0,26 jedince/km² (0,18-0,37 při 95 % konfidenčním intervalu), respektive minimálně 482 jedinců (317-751 při 95 % konfidenčním intervalu). Neinvazivní systematické vzorkování spojené s metodou SECR je praktickým nástrojem pro zkoumání reintrodukovaných populací, za předpokladu opakování výzkumu v určitém časovém horizontu můžeme sledovat genetickou diverzitu určité populace (S. M. Murphy et al., 2016).

5.7. Medvěd hnědý (*Ursus arctos*)

Stejně jako medvěd baribal je medvěd hnědý na Červeném seznamu označen jako druh málo dotčený, zároveň má tento druh modelový status v ekologii, fylogeografii (viz Obr. 11)

ochranářské biologii. Vyznačuje se holarktickým rozšířením (viz. Obr 10), jehož globální populace je stabilní (Collins, 2015; McLellan, Proctor, Huber, & Michel, 2017).



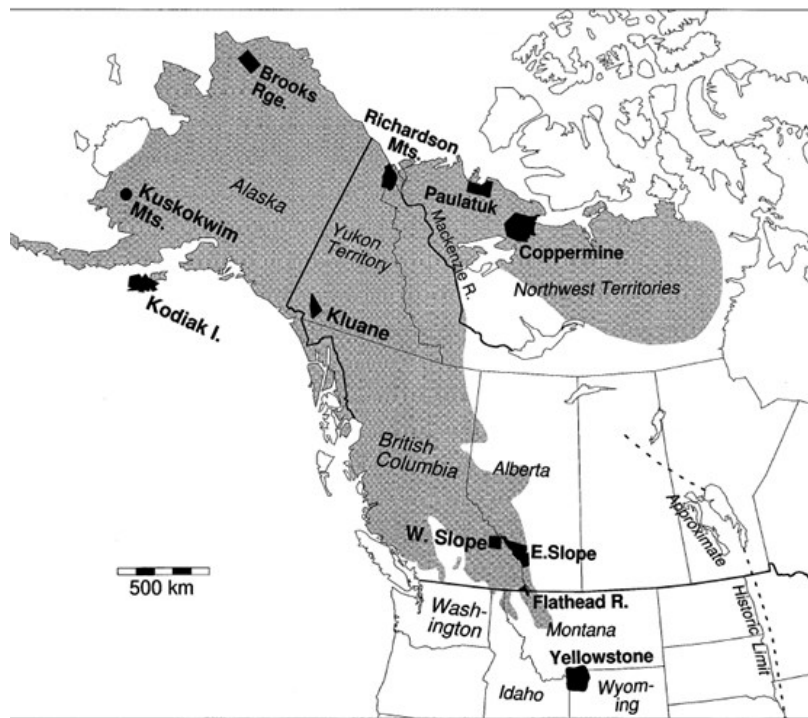
Obr.10 Současné rozšíření medvěda hnědého (tmavý odstín) plus historické rozšíření (světlý odstín); upraveno (Davison et al. 2011)



Obr. 11 Postglaciální model rekolonizace medvědů hnědých v Evropě, upraveno (Bray et al. 2013) příklad medvěda hnědého jako modelového druhu pro studium fylogeografie - vliv oscilací klimatu v Pleistocénu na populační strukturu (Hewitt 2000)

I navzdory stále se zvyšující fragmentaci krajiny je celková populace medvědů hnědých v Severní Americe relativně stabilní, některé populace, například na Aljašce nebo v severní Kanadě, jsou dokonce lidskou činností relativně nepoznamenány. Na základě osmi vysoce polymorfních mikrosatelitových lokusů byla určena očekávaná heterozygotnost pro severoamerické medvědy hnědé, nejvyšší $H_e=0,76$ pro jádrovou oblast výskytu Kluane, $H_e=0,60-0,75$ pro populace v severozápadních provinciích, jižním okraji

rozšíření a jihozápadní Aljašce, $H_e=0,55$ pro populaci v Yellowstonském Národním parku a $H_e=0,26$ pro populaci na ostrově Kodiak (viz Obr.11). Z tohoto výzkumu vyplývá, že pro udržení genetické variability jednotlivých populací je nejdůležitějším faktorem prostupnost krajiny a s tím spojený genový tok mezi populacemi. Populace v Národním parku Yellowstone a na ostrově Kodiak jsou izolované, z čehož plyne nízká genetická diverzita (Paetkau, Waits, et al. 1998).



Obr. 12 Současné rozšíření medvěda hnědého v Severní Americe (Paetkau, Waits, et al. 1998)

V minulosti se v oblasti Evropy výskyt velkých savců, včetně medvěda hnědého, vlivem člověka drasticky snížil (Ripple et al., 2014). V současné době, kdy probíhá tzv. krize biodiverzity, která se vyznačuje přelidněním a nadměrnou spotřebou, se často řeší otázka koexistence lidí a velkých karnivorů, kteří mají při nízkých populačních hustotách velké domovské okrsky (Gittleman, Funk, Macdonald, & Wayne, 2001) a často se tak dostávají do konfliktu s lidmi.

Existují dva modely, které řeší soužití člověka a šelem: 1. separační model, kde velcí karnivoři přežívají ve vzdálených a lidmi neobývaných oblastech divočiny (například rezervace v Africe nebo Severní Americe) (Packer et al., 2013), a za 2. koexistenční model, který se uplatňuje například v Evropě (Phalan, Onial, Balmford, & Green, 2011). Tento model spolu s ochrannou legislativou velkých šelem a podporou veřejnosti minimálně v oblasti Evropy funguje, důkazem může být to, že medvěd hnědý je v současné době nejpočetnějším zástupcem velkých karnivorů v Evropě (17 tisíc jedinců

v zemích Evropy kromě Ruska, Běloruska a Ukrajiny) (Chapron et al., 2014). Velké a stabilní populace se nacházejí v oblasti severovýchodní Evropy, Skandinávie, pohoří Karpat, Dinárských hor a pohoří Pindos. Naopak v západní Evropě jsou populace malé a izolované (Zedrosser et al. 2001), příkladem může být izolovaná populace v centrálním Rakousku. V této oblasti probíhal kontinuální neinvazivní výzkum mezi roky 2000 až 2005. Z celkem 764 vzorků chlupů a 241 vzorků trusu se pomocí 8 mikrosatelitových podařilo určit genotyp 295krát v případě chlupů (38,6% úspěšnost) a 84krát v případě trusu (34,9% úspěšnost). Bylo určeno 22 unikátních genotypů. Nejnížší očekávaná heterozygotnost byla zjištěna v roce 2005 ($H_e=0,59$), nejvyšší pak v roce 2002 ($H_e=0,63$). Pro tuto populaci byl mimo jiné sestaven rodokmen, z něž plyne, že se jedná o jednu rodinu a všichni jedinci jsou si navzájem příbuzní, což se z hlediska inbreedingu spolu s omezeným genovým tokem z okolních populací jeví jako největší hrozba pro budoucnost Rakouské populace (Kruckenhauser et al. 2009). Poměrně dost ohroženy jsou také asijské populace v medvědů hnědých, který se dají označit jako nejméně probádané. V Asii díky lidské činnosti celková populace v uplynulém století klesla o více než polovinu (Servheen and Herrero 1999). V Národním parku Deosai v Pákistánu se díky neinvazivnímu vzorkování podařilo určit 55 genotypů, ze kterých bylo následně určeno 28 jedinců. Pomocí dvou metod byly provedeny odhady celkové velikosti populace: 1. 47 jedinců (33-102 jedinců při 95 % konfidenčním intervalu) (Kohn et al. 1999); 2. 32 jedinců (28-58 jedinců při 95 % konfidenčním intervalu) (Eggert, Eggert, and Woodruff 2003). Tyto odhady byly více méně srovnatelné s daty, které byly získány v průběhu terénního sčítání v roce 2004 (n=38). Očekávaná heterozygotnost ($H_e=0,55$) byla srovnatelná s izolovanou populací v Yellowstonském Národním parku (Paetkau, Waits, et al. 1998), což značí limitaci genového toku mezi jednotlivými populacemi v Asii (Bellemain et al. 2006).

5.8. Medvěd lední (*Ursus maritimus*)

Na Červeném seznamu je tento druh uveden jako zranitelný s nejasnými populačními trendy (Wiig et al., 2015). Ačkoliv zatím neexistuje žádný důkaz o tom, že by neprobíhal genový tok mezi jednotlivými populacemi medvěda ledního (D. Paetkau et al., 1999; Peacock et al., 2015), stále intenzivnější změna klimatu, která se odráží na zkrácení doby zalednění na celém cirkumpolárním rozsahu rozšíření, což představuje v současné době největší hrozbu pro globální populaci medvěda ledního (Sahanatian & Derocher, 2012; Stirling & Derocher, 2012), může mít v budoucnu za následek omezení výměny genů mezi jednotlivými populacemi, což by mohlo vést ke vzniku silně izolovaných a ohrožených populací (Molnár, Derocher, Thiemann, & Lewis, 2010). V minulosti bylo při výzkumu populační genetiky medvědů ledních často využíváno

invazivních metod (Derocher & Stirling, 1995), nebo byly zpracovávány tkáňové vzorky jedinců ulovených Inuity (D. Paetkau et al., 1999). Zvířata byla odchytávána v průběhu mark-recapture leteckých průzkumů (Taylor, Laake, McLoughlin, Cluff, & Messier, 2009), což však často vede k následnému snížení tělesné kondice odchycených jedinců (M. Cattet, Boulanger, Stenhouse, Powell, & Reynolds-Hogland, 2008; M. R. L. Cattet, Caulkett, & Lunn, 2003) a nebo následné agresi vůči lidem (Clark, Lee, Freeman, & Clark, 2008). Řešením může být využití neinvazivní genetiky, například za pomoci chlupových pastí (Van Coeverden De Groot et al., 2013). Příkladem je výzkum byl uskutečněn na Pointu Barrow, nejsevernějším místě USA, který od sebe odděluje Beaufortovo a Čukotské moře. Během 11 vzorkovacích událostí v období od 6. listopadu 2010 do 14. února 2011 se podařilo získat z ostatního drátu (viz Obr.13), který byl umístěn kolem pozůstatků ulovených velryb grónských (*Balaena mysticetus* Linnaeus, 1758), celkem 200 vzorků chlupů. Pomocí 11 mikrosatelitových lokusů bylo úspěšně určeno 165 genetických profilů (82% úspěšnost) a stanoveny 97 jedinců. Při porovnání s datasey z předchozích studií se ukázalo, že 37 jedinců (38 %) již bylo dříve odchyceno a genotypováno, u těchto jedinců byly mimo jiné dostupné informace o věku. Pro stanovení velikosti populace, která se vyskytovala v uvedeném období v okolí mršin ulovených velryb, které jim sloužily jako potravní zdroj, byl použit capture-recapture model otevřené populace POPAN (Schwarz, 1996), nejednalo se o demograficky uzavřenou populaci, ale o subpopulaci, která je součástí větší populace (Kendall, 1999). Tento model vyčíslil subpopulaci, která se v období od listopadu 2010 do února 2011 pohybovala v okolí pozůstatků velryb, na 228 jedinců, což může představovat až 15% celkové populace medvědů ledních obývajících jižní Beaufortovo moře (Herreman & Peacock, 2013).



Obr.13 Ostnatý drát natažený kolem pozůstatků velryby grónské a medvědi lední zachycení fotopastí (Herreman & Peacock, 2013)

6. Závěr

Ačkoliv všechny druhy z čeledi Ursidae více či méně ohrožuje lidská činnost nebo její dopady, genetický výzkum jednotlivých druhů se významně liší. Pro pandy velké, vlajkový a deštníkový druh ochrany přírody v Číně, kterým je ve výzkumu věnováno mnoho úsilí, platí, že jejich počty se stabilizovaly a dokonce rostou, u jiných druhů – například medvěda malajského – je genetický výzkum teprve na začátku a není zcela jasné, kolik jedinců ve volné přírodě přežívá a jaké jsou populační trendy. Alarmující je i ten fakt, že například v některých zemích výskytu medvěda brýlatého v Jižní Americe nemůže probíhat výzkum volně žijících jedinců bez omezení kvůli napjaté politické situaci a s tím souvisejícím nebezpečím. Nejlépe prozkoumanými druhy jsou medvěd hnědý, medvěd baribal, medvěd ušatý, panda velká a medvěd lední – i u tohoto druhu se v dnešní době stále častěji přechází k využití neinvazivní genetiky, na rozdíl od dřívějších dob, kdy byli jedinci často imobilizováni pomocí anestetik střelbou z helikoptér, což mělo však často za následek snížení fitness jedinců a následnou agresi vůči lidem. Úroveň výzkumu jednotlivých druhů závisí především na velikosti jejich celkové populace a jejich rozšíření, socioekonomickým situacím a úrovni ochrany přírody v jednotlivých státech výskytu. Zbylé tři druhy – medvěda malajského, medvěda pyskatého a medvěda brýlatého – spojuje fakt, že se přirozeně vyskytují v chudších anebo přelidněných oblastech, kde ochrana přírody nedostává potřebný prostor a často tak dochází k masivnímu ničení prostředí. V budoucnu by těmto druhům měla být věnována adekvátní ochrana, je totiž pravděpodobné, že se vlivem úbytku vhodných habitatů a kvůli konfliktu s lidmi bude u těchto druhů zvyšovat riziko extinkčního víru. Všechny druhy medvědovitých však spojuje skutečnost, že jejich rozšíření a početnosti větší či menší měrou ovlivňuje lidská činnost nebo její dopady.

Seznam literatury

- Abbas, F., Bhatti, Z. I., Haider, J., & Mian, A. (2014). Bears in Pakistan: Distribution, Population Biology and Human Conflicts. *Journal of Bioresource Management*, 2(1). 1-13
- Akhtar, N. C. N. P.. (2008). Status of human-wildlife conflict and mitigation strategies in Marwahi forest division,. 1349–1358.
- Barba, M. De, Waits, L. P., Genovesi, P., Randi, E., Chirichella, R., & Cetto, E. (2010). Comparing opportunistic and systematic sampling methods for non-invasive genetic monitoring of a small translocated brown bear population. *Molecular Ecology* (19) 172–181.
- Bellemain, E., & Taberlet, P. (2004). Improved noninvasive genotyping method: Application to brown bear (*Ursus arctos*) faeces. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 519–522.
- Bellemain, Eva, Ali, M., Valentini, A., Swenson, J. E., Taberlet, P., & Decollato, S. G. (2006). Genetic tracking of the brown bear in northern Pakistan and implications for conservation. *Biological conservation* (4), 537 –547
- Berry, C. H. (1971). Corporate Growth and Diversification. *Journal of Law and Economics*, 14(2), 371–384
- Blomqvist, D., Angela Pauliny, Mikael Larsson, and Lars Åke Flodin. (2010). “Trapped in the Extinction Vortex? Strong Genetic Effects in a Declining Vertebrate Population.” *BMC Evolutionary Biology* 10(1),1–9.
- Bray, Sarah C. E., Jeremy J. Austin, Jessica L. Metcalf, Kjartan Østbye, Eivind Østbye, Stein Erik Lauritzen, Kim Aaris-Sørensen, Cristina Valdiosera, Christina J. Adler, and Alan Cooper. 2013. “Ancient DNA Identifies Post-Glacial Recolonisation, Not Recent Bottlenecks, as the Primary Driver of Contemporary MtDNA Phylogeography and Diversity in Scandinavian Brown Bears.” *Diversity and Distributions* 19(3), 245–56.
- Cattet, M., Boulanger, J., Stenhouse, G., Powell, R. A., & Reynolds-Hogland, M. J. (2008). An Evaluation of Long-Term Capture Effects in Ursids: Implications for Wildlife Welfare and Research. *Journal of Mammalogy*, 89(4), 973–990.
- Cattet, M. R. L., Caulkett, N. A., & Lunn, N. J. (2003). Anesthesia of polar bears using xylazine-zolazepam-tiletamine or zolazepam-tiletamine. *Journal of Wildlife Diseases*, 39(3)
- Chapron, G., Kaczensky, P., Linnell, J. D. C., Von Arx, M., Huber, D., Andrén, H., ... Boitani, L. (2014). Recovery of large carnivores in Europe’s modern human-dominated landscapes. *Science*, 346(6216), 1517–1519
- Clark, D. A., Lee, D. S., Freeman, M. M. R., & Clark, S. G. (2008). Polar bear conservation in Canada: Defining the policy problems. *Arctic*, 61(4), 347–360
- Collins, D. M. (2015). Ursidae. In *Fowler’s Zoo and Wild Animal Medicine*, Volume 8.
- Crow, J. F., & Kimura, M. (1970). *An introduction to population genetics theory*. New York, Evanston and London: Harper & Row, Publishers.
- Cuesta, F., Peralvo, M. F., & Manen, F. T. Van. (2003). Andean bear habitat use in the Oyacachi River Basin , Ecuador Andean bear habitat use in the Oyacachi River Basin , Ecuador. (January).
- Davison, John, Simon Y. W. Ho, Sarah C. Bray, Marju Korsten, Egle Tammeleht, Maris Hindrikson, Kjartan Østbye, Eivind Østbye, Stein Erik Lauritzen, Jeremy Austin, Alan Cooper, and Urmas Saarma. 2011. “Late-Quaternary Biogeographic Scenarios for the Brown Bear (*Ursus Arctos*), a Wild Mammal Model Species.” *Quaternary Science Reviews* 30(3–4):418–30.

- Derocher, A. E., & Stirling, I. (1995). Estimation of Polar Bear Population Size and Survival in Western Hudson Bay: Wiley on behalf of the Wildlife Society Stable URL : 17-03-2016 19. Journal of Wildlife Management, 59(2), 215–221.
- Dharaiya, N., Bargali, H.S. & Sharp, T. (2020). *Melursus ursinus*, Sloth Bear.
- Fernando, P., Pfrender, M. E., Encalada, S. E., & Lande, R. (2000). Mitochondrial DNA variation , phylogeography and population structure of the Asian elephant. 84(November 1999), 362–372.
- Fisher, R. A. (1930). The genetical theory of natural selection. In The genetical theory of natural selection.
- Franklin, I. R. (1980). Evolutionary change in small populations.
- Garshelis, D. & Steinmetz, R. (2016). *Ursus thibetanus* (errata version published in 2017). The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T22824A114252336. 8235, 31.
- Garshelis, D. L., Scheick, B. K., Doan-Crider, D. L., Beechman, J. J., & Obbard, M. E. (2016). *Ursus americanus*, American Black Bear (errata version published in 2017). The IUCN Red List of Threatened Species, 8235, e.T41687A114251609.
- Gittleman, J. L., Funk, S. M., Macdonald, D. W., & Wayne, R. K. (2001). Carnivore Conservation.
- Goldman, D. (1989). Molecular genetic-distance estimates among the ursidae as indicated by one – and two-dimensional protein electrophoresis. 43(2), 282–295.
- Herreman, J., & Peacock, E. (2013). Polar bear use of a persistent food subsidy: Insights from non-invasive genetic sampling in Alaska. *Ursus*, 24(2), 148–163.
- Hewitt, G. 2000. “The Genetic Legacy of the Quaternary Ice Ages.” *Nature* 405(6789):907–13.
- IUCN. (2016). 121745669 @ www.iucnredlist.org. Retrieved from <https://www.iucnredlist.org/species/712/121745669#external-data>
- IUCN. (2018). *Tremarctos ornatus*,. 8235.
- Jamieson, I. G., & Allendorf, F. W. (2012). How does the 50/500 rule apply to MVPs? *Trends in Ecology and Evolution*, 27(10), 578–584
- Kadariya, R., Shimozuru, M., Maldonado, J. E., Moustafa, M. A. M., Sashika, M., & Tsubota, T. (2018). High genetic diversity and distinct ancient lineage of Asiatic black bears revealed by non-invasive surveys in the Annapurna Conservation Area, Nepal. *PLoS ONE*, 13(12), 1–22.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., & Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16(5), 1099–1106.
- Kattan, G., Hernández, O. L., Goldstein, I., Rojas, V., Murillo, O., Gómez, C., ... Cuesta, F. (2004). Range fragmentation in the spectacled bear *Tremarctos ornatus* in the northern Andes. *Oryx*, 38(2), 155–163
- Kendall, W. L. (1999). Robustness of Closed Capture-Recapture Methods to Violations of the Closure Assumption. *Ecology*, 80(8), 2517–2525.
- Kim, Y. K., Hong, Y. J., Min, M. S., Kim, K. S., Kim, Y. J., Voloshina, I., ... Lee, H. (2011). Genetic status of asiatic black bear (*Ursus thibetanus*) reintroduced into South Korea based on mitochondrial DNA and microsatellite loci analysis. *Journal of Heredity*, 102(2), 165–174

- Kruckenhauser, Luise, Georg Rauer, Barbara Däubel, and Elisabeth Haring. 2009. "Genetic Monitoring of a Founder Population of Brown Bears (*Ursus Arctos*) in Central Austria." *Conservation Genetics* 10(5):1223–33.
- Krützen, M., & Ph, D. (n.d.). Collection and storage of non-invasive DNA samples from wild primates.
- Kunde, M. N., Martins, R. F., Premier, J., Fickel, J., & Förster, D. W. (2020). Population and landscape genetic analysis of the Malayan sun bear *Helarctos malayanus*. *Conservation Genetics*, 21(1),
- Ladislav Paule, Diana Krajmerová, T. S. (2013). *Príručka spolupracovníka pri výskume medveďov pomocou genetických metód*.
- Laura E, F., Joseph, R., & Melvin E, S. (2000). Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology*, 9, 1583–1590
- May, R. M. (1973). Qualitative stability in model ecosystems. *Ecology*, 54(3), 638–641.
- McLellan, B. N., Proctor, M. F., Huber, D., & Michel, S. (2017). *Ursus arctos*, Brown Bear Assessment by: McLellan, B.N., Proctor, M.F., Huber, D. & Michel, S. The IUCN Red List of Threatened Species, 8235.
- Molnár, P. K., Derocher, A. E., Thiemann, G. W., & Lewis, M. A. (2010). Predicting survival, reproduction and abundance of polar bears under climate change. *Biological Conservation*, 143(7), 1612–1622
- Mukesh, Sharma, L. K., Charoo, S. A., & Sathyakumar, S. (2015). Conflict bear translocation: Investigating population genetics and fate of bear translocation in Dachigam National Park, Jammu and Kashmir, India. *PLoS ONE*, 10(8), 1–17.
- Mumma, M. A., Zieminski, C., Fuller, T. K., Mahoney, S. P., & Waits, L. P. (2015). Evaluating noninvasive genetic sampling techniques to estimate large carnivore abundance. *Molecular Ecology Resources*, 15(5), 1133–1144
- Murphy, M. A., Kendall, K. C., Robinson, A., & Waits, L. P. (2007). The impact of time and field conditions on brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA amplification. *Conservation Genetics*, 8(5), 1219–1224
- Murphy, M. A., Waits, L. P., & Kendall, K. C. (2003). The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (*Ursus arctos*). *Molecular Ecology*, 12(8), 2261–2265
- Murphy, S. M., Cox, J. J., Augustine, B. C., Hast, J. T., Guthrie, J. M., Wright, J., ... Plaxico, J. H. (2016). Characterizing recolonization by a reintroduced bear population using genetic spatial capture–recapture. *Journal of Wildlife Management*, 80(8), 1390–1407.
- Ohnishi, N., Saitoh, T., Ishibashi, Y., & Oi, T. (2007). Low genetic diversities in isolated populations of the Asian black bear (*Ursus thibetanus*) in Japan, in comparison with large stable populations. *Conservation Genetics*, 8(6), 1331–1337
- Ostrander, E. A., Sprague, G. F., & Rine, J. (1993). Identification and Characterization of Dinucleotide Repeat (CA)_n Markers for Genetic Mapping in Dog. *Genomics*, 16(1), 207–213.
- Packer, C., Loveridge, A., Canney, S., Caro, T., Garnett, S. T., Pfeifer, M., ... Polasky, S. (2013). Conserving large carnivores: Dollars and fence. *Ecology Letters*, 16(5), 635–641.
- Paetkau, D., Amstrup, S. C., Born, E. W., Calvert, W., Derocher, A. E., Garner, G. W., ... Strobeck, C. (1999). Genetic structure of the world's polar bear populations. *Molecular Ecology*, 8(10), 1571–1584

- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I., & Strobeck, C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4(3), 347–354.
- Paetkau, D., & Strobeck, C. (1994). Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology*, 3(5), 489–495.
- Paetkau, David, Shields, G. F., & Strobeck, C. (1998). Gene flow between insular , coastal and interior populations of brown bears in Alaska. *Molecular Ecology*, 7, 1283–1292.
- Paetkau, David, Lisette P. Waits, Peter L. Clarkson, Lance Craighead, Ernie Vyse, Ryk Ward, and Curtis Strobeck. 1998. “Variation in Genetic Diversity across the Range of North American Brown Bears.” *Conservation Biology* 12(2):418–29.
- Pagès, M., Calvignac, S., Klein, C., Paris, M., Hughes, S., & Hänni, C. (2008). Combined analysis of fourteen nuclear genes refines the Ursidae phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47(1), 73–83
- Pagès, M., Maudet, C., Bellemain, E., Taberlet, P., Hughes, S., & Hänni, C. (2009). A system for sex determination from degraded DNA: A useful tool for palaeogenetics and conservation genetics of ursids. *Conservation Genetics*, 10(4), 897–907
- Peacock, E., Sonsthagen, S. A., Obbard, M. E., Boltunov, A., Regehr, E. V., Ovsyanikov, N., ... Talbot, S. L. (2015). Implications of the circumpolar genetic structure of polar bears for their conservation in a rapidly warming Arctic. *PLoS ONE*, 10(1), 136126.
- Pérez, T., Vázquez, F., Naves, J., Fernández, A., Corao, A., Albornoz, J., & Domínguez, A. (2009). Non-invasive genetic study of the endangered Cantabrian brown bear (*Ursus arctos*). *Conservation Genetics*, 10(2), 291–301
- Phalan, B., Onial, M., Balmford, A., & Green, R. E. (2011). Reconciling Food Production and. *Science*, 333(September), 1289–1291
- Piggott, M. P. (2004). Effect of sample age and season of collection on the reliability of microsatellite genotyping of faecal DNA. *Wildlife research*, 485–493.
- Poissant, J., & Davis, C. S. (2011). Isolation and characterization of ten polar bear (*Ursus maritimus*) microsatellite loci and cross-amplification in other Ursidae. *Conservation Genetics Resources*, 3(4), 637–639
- Qiao, M., Connor, T., Shi, X., Huang, J., Huang, Y., Zhang, H., & Ran, J. (2019). Population genetics reveals high connectivity of giant panda populations across human disturbance features in key nature reserve. (October 2018), 1809–1819
- Ripple, W. J., Estes, J. A., Beschta, R. L., Wilmers, C. C., Ritchie, E. G., Hebblewhite, M., ... Wirsing, A. J. (2014). Status and ecological effects of the world’s largest carnivores. *Science*, 343(6167).
- Roughgarden, J. (1975). A simple model for population dynamics in stochastic environments. *The American Naturalist*, 109(970), 713–736.
- Ruiz-García, M. (2003). Molecular population genetic analysis of the spectacled bear (*Tremarctos*). *Hereditas*, 93, 81–93.
- Ruiz-García, M., Orozco-terWengel, P., Castellanos, A., & Arias, L. (2005). Microsatellite Analysis of the Spectacled Bear (*Tremarctos ornatus*) Across its Range Distribution. *Genes & Genetic Systems*, 80(1), 57–69
- Sahanatien, V., & Derocher, A. E. (2012). Monitoring sea ice habitat fragmentation for polar bear conservation. *Animal Conservation*, 15(4), 397–406.

- Schwarz, C. J. (1996). A General Methodology for the Analysis of Capture-Recapture Experiments in Open Populations Author (s): Carl James Schwarz and A . Neil Arnason Published by : International Biometric Society Stable
- Scotson, L., Fredriksson, G., Augeri, D., Cheah, C., Ngoprasert, D., & Wai-Ming, W. (2018). *Helarctos malayanus* (errata version published in 2018). The IUCN Red List of Threatened Species 2017, 8235
- Servheen, C., & Herrero, S. (1999). The Status Survey and Conservation Action Plan Bears.
- Shaffer, M. L. (1981). Minimum Population Sizes for Species Conservation. *BioScience*, 31(2), 131–134
- Sharma, S., Dutta, T., Maldonado, J. E., Wood, T. C., Panwar, H. S., & Seidensticker, J. (2013). Selection of microsatellite loci for genetic monitoring of sloth bears. *Ursus*, 24(2), 164–169.
- Skrbinšek, T., JelenČič, M., Waits, L., Kos, I., Jerina, K., & Trontelj, P. (2012). Monitoring the effective population size of a brown bear (*Ursus arctos*) population using new single-sample approaches. *Molecular Ecology*, 21(4), 862–875.
- Skrbinšek, T., Jelenčič, M., Waits, L., Kos, I., & Trontelj, P. (2010). Highly efficient multiplex PCR of noninvasive DNA does not require pre-amplification. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 495–501.
- Skrbinšek, T., Luštrik, R., Majić-Skrbinšek, A., Potočnik, H., Kljun, F., Jelenčič, M., ... Trontelj, P. (2019). From science to practice: genetic estimate of brown bear population size in Slovenia and how it influenced bear management. *European Journal of Wildlife Research*, 65:29.
- Soule, M. E. (1980). Thresholds for Survival: Maintaining Fitness and Evolutionary Potential. *Conservation Biology: An Evolutionary-Ecological Perspective*, 151–170.
- Stenglein, J. L., Barba, M. D. E., Ausband, D. E., & Waits, L. P. (2010). Impacts of sampling location within a faeces on DNA quality in two carnivore species. 109–114.
- Stirling, I., & Derocher, A. E. (2012). Effects of climate warming on polar bears: A review of the evidence. *Global Change Biology*, 18(9), 2694–2706.
- Taberlet P. (1997). Noninvasive genetic tracking of the endangered species Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology*, 6, 869–876.
- Taberlet, P., Mattock, H., Dubois-Paganon, C., & Bouvet, J. (1993). Sexing free-ranging brown bears *Ursus arctos* using hairs found in the field. *Molecular Ecology*, 2(6), 399–403
- Tallmon, D. a, Bellemain, E., Taberlet, P., & Swenson, J. E. (2004). Genetic monitoring of Scandinavian brown bear effective population size and immigration. *Journal of Wildlife Management*, 68, 960–965
- Taylor, M. K., Laake, J., McLoughlin, P. D., Cluff, H. D., & Messier, F. (2009). Demography and population viability of polar bears in the Gulf of Boothia, Nunavut. *Marine Mammal Science*, 25(4), 778–796
- Uno, R., Doko, T., Ohnishi, N., & Tamate, H. B. (2015). Population Genetic Structure of the Asian Black Bear (*Ursus thibetanus*) within and Across Management Units in Northern Japan . *Mammal Study*, 40(4), 231–244
- Van Coeverden De Groot, P., Wong, P. B. Y., Harris, C., Dyck, M. G., Kamookak, L., Pagès, M., ... Boag, P. T. (2013). Toward a non-invasive inuit polar bear survey: Genetic data from polar bear hair snags. *Wildlife Society Bulletin*, 37(2), 394–401
- Viteri, M. P., & Waits, L. P. (2009). Identifying polymorphic microsatellite loci for Andean bear research. *Ursus*, 20(2), 102–108

- Waits, L. P., & Paetkau, D. (2006). Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management*, 69(4), 1419–1433.
- Waits, L. P., Sullivan, J., Brien, S. J. O., & Ward, R. H. (1999). Rapid Radiation Events in the Family Ursidae Indicated by Likelihood Phylogenetic Estimation from Multiple Fragments of mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13(1), 82–92.
- Waits, L., Paetkau, D., & Strobeck, C. (2000). Genetics of the Bears of the World. 25–32.
- Wiig, Ø., Amstrup, S., Atwood, T., Laidre, K., Lunn, N., Obbard, M., ... Thiemann, G. (2015). *Ursus maritimus*, Polar bear. The IUCN Red List of Threatened Species 2015, 8235, 31.
- Wilson Don E., M. R. A. (2009). Handbook of the mammals of the world.
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics.*, Vol. 16, pp. 97–159.
- Yu, L., Li, Q., Ryder, O. A., & Zhang, Y. (2004). Phylogeny of the bears (Ursidae) based on nuclear and mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32, 480–494
- Zhan, X., Li, M., Zhang, Z., Goossens, B., Chen, Y., Wang, H., ... Wei, F. (2006). Molecular censusing doubles giant panda population estimate in a key nature reserve. *Current Biology*, 16(12), 451–452
- Zhao, C., Yue, B., Ran, J., Moermond, T., Hou, N., Yang, X., & Gu, X. (2016). Relationship between human disturbance and Endangered giant panda *Ailuropoda melanoleuca* habitat use in the Daxiangling Mountains. *Oryx*, 51(1), 146–152